



B/5

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenl gungsschrift**
10 **DE 199 47 791 A 1**

51 Int. Cl. 7:
C 07 H 21/00
C 12 N 15/52
C 12 N 15/60
C 12 P 13/04
C 12 P 13/08

21 Aktenzeichen: 199 47 791.4
22 Anmeldetag: 5. 10. 1999
43 Offenlegungstag: 12. 4. 2001

DE 199 47 791 A 1

71 Anmelder:
Degussa-Hüls AG, 60311 Frankfurt, DE

72 Erfinder:
Möckel, Bettina, Dr., 40597 Düsseldorf, DE;
Pfefferle, Walter, Dr., 33790 Halle, DE; Hermann,
Thomas, Dr., 33739 Bielefeld, DE; Pühler, Alfred,
Prof., 33739 Bielefeld, DE; Kalinowski, Jörn, Dr.,
33615 Bielefeld, DE; Bathe, Brigitte, Dr., 33154
Salzkotten, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

64 Neue für das eno-Gen codierende Nukleotidsequenzen

- 57 Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ. ID Nr. 2 enthält,
 - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ. ID Nr. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),
- und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verstärkung des eno-Gens.

DE 199 47 791 A 1

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung sind für das eno-Gen kodierende Nukleotidsequenzen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen das eno-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie insbesondere aber in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien insbesondere *Corynebacterium glutamicum* hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verbesserungsbemühungen können fermentations-technische Maßnahmen wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z. B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z. B. das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Aminosäuren sind und L-Lysin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung Aminosäure produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht. Übersichtsartikel hierzu findet man unter anderem bei Kinoshita ("Glutamic Acid Bacteria", in: *Biology of Industrial Microorganisms*, Demain and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985, 115-142), Hilliger (*BioTec* 2, 40-44 (1991)), Eggeling (*Amino Acids* 6: 261-272 (1994)), Jetten und Sinskey (*Critical Reviews in Biotechnology* 15, 73-103 (1995)) und Sahm et al. (*Annals of the New York Academy of Science* 782, 25-39 (1996)).

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren insbesondere L-Lysin bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Aminosäuren insbesondere L-Lysin finden in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie und insbesondere in der Tierernährung Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren insbesondere L-Lysin bereitzustellen.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Base sondern auch die Salze wie z. B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ-ID-No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (1) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (1).

Weitere Gegenstände sind

- ein Polynukleotid gemäß Anspruch 4, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,
- ein Polynukleotid gemäß Anspruch 6, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält
- ein Vektor, enthaltend das Polypeptid gemäß Anspruch 1, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit

der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind geeignet als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für Enolase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Enolase-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin geeignet als Primer zur Herstellung von DNA von Genen, die für Enolase codieren, durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Basenpaaren.

"Isoliert" bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

"Polynukleotid" bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter "Polypeptiden" versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schliessen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Enolase und auch solche ein, die zu wenigstens 70% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90% bis 95% Identität mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren insbesondere L-Lysin unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits eine Aminosäure produzieren, und in denen die für das eno-Gen codierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind die zum Beispiel bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709

Brevibacterium flavum FERM-P 1708

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und

Corynebacterium glutamicum DSM5715.

Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Enolase (EC 4.2.1.11) kodierende eno-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

Zur Isolierung des eno-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252: 255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84: 2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16: 1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Viera et al., 1982, Gene, 19: 259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74: 5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen *eno* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *eno*-Genproduktes dargestellt.

- 5 Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 oder Teilen von SEQ ID NO 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z. B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als "Sinnmutationen" (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169: 751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77: 237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3: 240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6: 1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 oder Teilen von SEQ ID NO 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID NO 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Basenpaaren.

- 20 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des *eno*-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren insbesondere L-Lysin produzieren.

- Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Lysin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60: 512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

- 45 Beispielhaft wurde das erfindungsgemäße *eno*-Gen mit Hilfe von Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) oder pHs2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGAL. Andere Plasmidvektoren wie z. B. solche die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben dem *eno*-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu überexprimieren.

- 55 So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin

- gleichzeitig das für die Dihydropicolinat-Synthase kodierende *dapA*-Gen (EP-B 0 197 335), oder
- gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende *gap*-Gen (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174: 6076-6086), oder
- 60 - gleichzeitig das für die Triosephosphat Isomerase kodierende *tpi*-Gen (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174: 6076-6086), oder
- gleichzeitig das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende *pgk*-Gen (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174: 6076-6086), oder
- gleichzeitig das für die Pyruvat Carboxylase kodierende *pyc*-Gen (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174: 6076-6086), oder
- 65 - gleichzeitig das für den Lysin-Export kodierende *lysI*-Gen (DE-A-195 48 222)

überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *eno*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natriumhaltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasgemischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Lysin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Lysin erfolgt kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33: 168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84: 2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16: 1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1: 190) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Isolierung und Sequenzierung des eno-Gens

5 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der
10 Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A., 87: 4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123: 343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1: 190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert. Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A., 74: 5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18: 1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem
20 "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29 : 1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14: 217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP
30 (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14: 217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25: 3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NO 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1275 Basenpaaren, welches als eno-Gen bezeichnet wurde. Das eno-Gen kodiert für ein Protein von 425
35 Aminosäuren.

DE 199 47 791 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

<120> Neue für das eno-Gen codierende Nukleotidsequenzen

<130> 990152 BT

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1578

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (151)..(1425)

<400> 1

ggctggggat atgggtagtt ttcgccacta atttcaactg attgcctcat cgaacaaga 60

ttcgtgcaac aattgggtgt agacgtgatt gaagacattt gatcacgtga ataattctag 120

ttagctccca agttggcata ggaggccaca gtg gct gaa atc atg cac gta ttc 174

Val Ala Glu Ile Met His Val Phe

1 5

gct cgc gaa att ctc gac tcc cgc ggt aac cca acc gtc gag gca gag 222

Ala Arg Glu Ile Leu Asp Ser Arg Gly Asn Pro Thr Val Glu Ala Glu

10 15 20

gtt ttc ctg gat gac ggt tcc cac ggt gtc gca ggt gtt cca tcc ggc 270

Val Phe Leu Asp Asp Gly Ser His Gly Val Ala Gly Val Pro Ser Gly

25 30 35 40

gca tcc acc ggc gtc cac gag gct cat gag ctg cgt gac ggt ggc gat 318

Ala Ser Thr Gly Val His Glu Ala His Glu Leu Arg Asp Gly Gly Asp

45 50 55

cgc tac ctg ggc aag ggc gtt ttg aag gca gtt gaa aac gtc aac gaa 366

Arg Tyr Leu Gly Lys Gly Val Leu Lys Ala Val Glu Asn Val Asn Glu

60 65 70

gaa atc ggc gac gag ctc gct ggc cta gag gct gac gat cag cgc ctc 414

Glu Ile Gly Asp Glu Leu Ala Gly Leu Glu Ala Asp Asp Gln Arg Leu

75 80 85

atc gac gaa gca atg atc aag ctt gat ggc acc gcc aac aag tcc cgc 462

Ile Asp Glu Ala Met Ile Lys Leu Asp Gly Thr Ala Asn Lys Ser Arg

90 95 100

DE 199 47 791 A 1

	ctg ggt gca aac gca atc ctt ggt gtt tcc atg gct gtt gca aag gct	510
	Leu Gly Ala Asn Ala Ile Leu Gly Val Ser Met Ala Val Ala Lys Ala	
	105 110 115 120	
5	gct gct gat tcc gca ggc ctc cca ctg ttc cgc tac atc ggt gga cca	558
	Ala Ala Asp Ser Ala Gly Leu Pro Leu Phe Arg Tyr Ile Gly Gly Pro	
	125 130 135	
10	aac gca cac gtt ctt cca gtt cca atg atg aac atc atc aac ggt ggc	606
	Asn Ala His Val Leu Pro Val Pro Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly	
	140 145 150	
15	gct cac gct gac tcc ggt gtt gac gtt cag gaa ttc atg atc gct cca	654
	Ala His Ala Asp Ser Gly Val Asp Val Gln Glu Phe Met Ile Ala Pro	
	155 160 165	
20	atc ggt gca gag acc ttc tct gag gct ctc cgc aac ggc gcg gag gtc	702
	Ile Gly Ala Glu Thr Phe Ser Glu Ala Leu Arg Asn Gly Ala Glu Val	
	170 175 180	
25	tac cac gca ctg aag tcc gtc atc aag gaa aag ggc ctg tcc acc gga	750
	Tyr His Ala Leu Lys Ser Val Ile Lys Glu Lys Gly Leu Ser Thr Gly	
	185 190 195 200	
30	ctt ggc gat gag ggc ggc ttc gct cct tcc gtc ggc tcc acc cgt gag	798
	Leu Gly Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Ser Val Gly Ser Thr Arg Glu	
	205 210 215	
35	gct ctt gac ctt atc gtt gag gca atc gag aag gct ggc ttc acc cca	846
	Ala Leu Asp Leu Ile Val Glu Ala Ile Glu Lys Ala Gly Phe Thr Pro	
	220 225 230	
40	ggc aag gac atc gct ctt gct ctg gac gtt gct tcc tct gag ttc ttc	894
	Gly Lys Asp Ile Ala Leu Ala Leu Asp Val Ala Ser Ser Glu Phe Phe	
	235 240 245	
45	aag gac ggc acc tac cac ttc gaa ggt ggc cag cac tcc gca gct gag	942
	Lys Asp Gly Thr Tyr His Phe Glu Gly Gly Gln His Ser Ala Ala Glu	
	250 255 260	
50	atg gca aac gtt tac gct gag ctc gtt gac gcg tac cca atc gtc tcc	990
	Met Ala Asn Val Tyr Ala Glu Leu Val Asp Ala Tyr Pro Ile Val Ser	
	265 270 275 280	
55	atc gag gac cca ctg cag gaa gat gac tgg gag ggt tac acc aac ctc	1038
	Ile Glu Asp Pro Leu Gln Glu Asp Asp Trp Glu Gly Tyr Thr Asn Leu	
	285 290 295	
60	acc gca acc atc ggc gac aag gtt cag atc gtt ggc gac gac ttc ttc	1086
	Thr Ala Thr Ile Gly Asp Lys Val Gln Ile Val Gly Asp Asp Phe Phe	
	300 305 310	
65	gtc acc aac cct gag cgc ctg aag gag ggc atc gct aag aag gct gcc	1134
	Val Thr Asn Pro Glu Arg Leu Lys Glu Gly Ile Ala Lys Lys Ala Ala	
	315 320 325	

DE 199 47 791 A 1

aac tcc atc ctg gtt aag gtg aac cag atc ggt acc ctc acc gag acc	1182	
Asn Ser Ile Leu Val Lys Val Asn Gln Ile Gly Thr Leu Thr Glu Thr		
330 335 340		
ttc gac gct gtc gac atg gct cac cgc gca ggc tac acc tcc atg atg	1230	5
Phe Asp Ala Val Asp Met Ala His Arg Ala Gly Tyr Thr Ser Met Met		
345 350 355 360		
tcc cac cgt tcc ggt gag acc gag gac acc acc att gct gac ctc gca	1278	10
Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Thr Thr Ile Ala Asp Leu Ala		
365 370 375		
gtt gca ctc aac tgt ggc cag atc aag act ggt gct cca gca cgt tcc	1326	15
Val Ala Leu Asn Cys Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Ala Arg Ser		
380 385 390		
gac cgt gtc gca aag tac aac cag ctt ctc cgc atc gag cag ctg ctt	1374	20
Asp Arg Val Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Leu Arg Ile Glu Gln Leu Leu		
395 400 405		
ggc gac gcc ggc gtc tac gca ggt cgc agc gca ttc cca cgc ttt cag	1422	25
Gly Asp Ala Gly Val Tyr Ala Gly Arg Ser Ala Phe Pro Arg Phe Gln		
410 415 420		
ggc taaataaaag cgcttttcga cgcccggtaa cctcaagggt gccgggcgtc	1475	
Gly		30
425		
gttgcccttac tactgttact ggtgtgacta tgatcgagga ttatggcaaa gcagaagaaa	1535	
actcataaag gccttggtcc tgtctcaagc agggaaactg ctt	1578	35
<210> 2		
<211> 425		
<212> PRT		
<213> Corynebacterium glutamicum		40
<400> 2		
Val Ala Glu Ile Met His Val Phe Ala Arg Glu Ile Leu Asp Ser Arg		45
1 5 10 15		
Gly Asn Pro Thr Val Glu Ala Glu Val Phe Leu Asp Asp Gly Ser His		
20 25 30		
Gly Val Ala Gly Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Val His Glu Ala		50
35 40 45		
His Glu Leu Arg Asp Gly Gly Asp Arg Tyr Leu Gly Lys Gly Val Leu		55
50 55 60		
Lys Ala Val Glu Asn Val Asn Glu Glu Ile Gly Asp Glu Leu Ala Gly		60
65 70 75 80		
Leu Glu Ala Asp Asp Gln Arg Leu Ile Asp Glu Ala Met Ile Lys Leu		65
85 90 95		

DE 199 47 791 A 1

Asp Gly Thr Ala Asn Lys Ser Arg Leu Gly Ala Asn Ala Ile Leu Gly
 100 105 110
 5 Val Ser Met Ala Val Ala Lys Ala Ala Ala Asp Ser Ala Gly Leu Pro
 115 120 125
 Leu Phe Arg Tyr Ile Gly Gly Pro Asn Ala His Val Leu Pro Val Pro
 130 135 140
 10 Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly Ala His Ala Asp Ser Gly Val Asp
 145 150 155 160
 Val Gln Glu Phe Met Ile Ala Pro Ile Gly Ala Glu Thr Phe Ser Glu
 15 165 170 175
 Ala Leu Arg Asn Gly Ala Glu Val Tyr His Ala Leu Lys Ser Val Ile
 180 185 190
 20 Lys Glu Lys Gly Leu Ser Thr Gly Leu Gly Asp Glu Gly Gly Phe Ala
 195 200 205
 Pro Ser Val Gly Ser Thr Arg Glu Ala Leu Asp Leu Ile Val Glu Ala
 25 210 215 220
 Ile Glu Lys Ala Gly Phe Thr Pro Gly Lys Asp Ile Ala Leu Ala Leu
 225 230 235 240
 30 Asp Val Ala Ser Ser Glu Phe Phe Lys Asp Gly Thr Tyr His Phe Glu
 245 250 255
 Gly Gly Gln His Ser Ala Ala Glu Met Ala Asn Val Tyr Ala Glu Leu
 35 260 265 270
 Val Asp Ala Tyr Pro Ile Val Ser Ile Glu Asp Pro Leu Gln Glu Asp
 275 280 285
 40 Asp Trp Glu Gly Tyr Thr Asn Leu Thr Ala Thr Ile Gly Asp Lys Val
 290 295 300
 Gln Ile Val Gly Asp Asp Phe Phe Val Thr Asn Pro Glu Arg Leu Lys
 305 310 315 320
 45 Glu Gly Ile Ala Lys Lys Ala Ala Asn Ser Ile Leu Val Lys Val Asn
 325 330 335
 Gln Ile Gly Thr Leu Thr Glu Thr Phe Asp Ala Val Asp Met Ala His
 50 340 345 350
 Arg Ala Gly Tyr Thr Ser Met Met Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu
 355 360 365
 55 Asp Thr Thr Ile Ala Asp Leu Ala Val Ala Leu Asn Cys Gly Gln Ile
 370 375 380
 Lys Thr Gly Ala Pro Ala Arg Ser Asp Arg Val Ala Lys Tyr Asn Gln
 60 385 390 395 400
 Leu Leu Arg Ile Glu Gln Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Tyr Ala Gly
 405 410 415
 65 Arg Ser Ala Phe Pro Arg Phe Gln Gly
 420 425

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - e) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ-ID-No. 1, oder
 - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
7. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:
 - a) Fermentation der die L-Lysin produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das eno-Gen oder dafür codierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert.
 - b) Anreicherung von der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
 - c) Isolieren von der L-Aminosäure.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung des L-Lysins verringern.
10. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das eno-Gen codierende Nukleotidsequenz trägt.
11. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man coryneforme Bakterien verwendet, die L-Lysin herstellen.
12. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig das für die Dihydropicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen überexprimiert wird.
13. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig ein S-(2-Aminoethyl)-Cystein-Resistenz vermittelndes DNA-Fragment amplifiziert wird.
14. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig das für die Gyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen überexprimiert wird.
15. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig das für die Triosephosphat Isomerase codierende tpi-Gen überexprimiert wird.
16. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig das für die 3-Phosphatglycerat Kinase codierende pgk-Gen überexprimiert wird.
17. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen überexprimiert wird.

- Leerseite -